

JP2000-152781A

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-152781

(P2000-152781A)

(43) 公開日 平成12年6月6日 (2000.6.6)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	テマコード* (参考)
C 1 2 N 7/00		C 1 2 N 7/00	4 B 0 2 4
15/09	Z N A	A 6 1 K 31/00	6 3 1 N 4 B 0 6 5
// A 6 1 P 31/20		48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00		C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数8 OL (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平10-328566

(22) 出願日 平成10年11月18日 (1998. 11. 18)

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 斎藤 泉

東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412号

(72) 発明者 鐘ヶ江 裕美

東京都品川区西五反田8丁目10番14-1405号

(74) 代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な組換えアデノウイルス

(57) 【要約】

【課題】 遺伝子治療の分野において一層安全性の高い遺伝子治療用ベクターの作製のための材料として、アデノウイルス左端 ITR とパッケージング配列との間の新たな位置にリコンビナーゼ認識配列を挿入した組換えアデノウイルスを提供すること。

【解決手段】 下記配列：(1) 左端逆方向反復配列、

(2) パッケージング配列、(3) 前記左端逆方向反復配列と前記パッケージング配列の中間領域に位置するリコンビナーゼ認識配列、および(4) 前記パッケージング配列の下流領域に位置する、前記リコンビナーゼ認識配列を認識するリコンビナーゼにより認識される少なくとももう1つのリコンビナーゼ認識配列、をゲノム中に含有してなる組換えアデノウイルス。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記配列：

(1) 左端逆方向反復配列、(2) パッケージング配列、(3) 前記左端逆方向反復配列と前記パッケージング配列の中間領域に位置するリコンビナーゼ認識配列、および(4) 前記パッケージング配列の下流領域に位置する、前記リコンビナーゼ認識配列を認識するリコンビナーゼにより認識される少なくとももう 1 つのリコンビナーゼ認識配列、をゲノム中に含有してなる組換えアデノウイルス。

【請求項 2】 アデノウイルスがヒトアデノウイルス 2 型または 5 型である、請求項 1 記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 3】 リコンビナーゼ認識配列がヒトアデノウイルス 5 型の塩基配列 104 ～194 位の間のいずれかに位置する、請求項 2 記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 4】 リコンビナーゼ認識配列が該塩基配列の 143 ～148 位のいずれかに位置する、請求項 3 記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 5】 リコンビナーゼ認識配列がバクテリオファージ P 1 由来のリコンビナーゼ Cre の基質である、請求項 1 ～ 4 いずれか記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 6】 リコンビナーゼ認識配列が loxP 配列である、請求項 5 記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 7】 リコンビナーゼ認識配列が酵母由来のリコンビナーゼ FLP の基質である、請求項 1 ～ 4 いずれか記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 8】 リコンビナーゼ認識配列が FRT 配列である、請求項 7 記載の組換えアデノウイルス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、組換えアデノウイルスに関する。

【0002】

【従来の技術】アデノウイルスベクターは、遺伝子導入効率の高さ、高力価ウイルス液の調製の容易さ、非増殖細胞にも遺伝子導入可能ななどの利点から、遺伝子治療用のベクターとして有望視されている。現在汎用されているアデノウイルスベクターは、アデノウイルスの増殖に必須な E1 遺伝子を欠失させた非増殖型アデノウイルスベクターであるが、ヒトや動物個体に投与した場合、アデノウイルス蛋白質が発現することが知られており、安全性の観点から、ウイルスにコードされる蛋白質がなるべく発現しない構造のベクターが望まれている。

【0003】そのベクターの構造とは、治療用遺伝子など目的の外来遺伝子を挿入し、かつアデノウイルス由来の蛋白質をコードする遺伝子の一部もしくは全てを除いたものである。しかし、かかる性質を保持するウイルス(目的ベクターウイルス)は単独では増殖できないため、もう一つのアデノウイルス(ヘルパーウイルス)と

ともに宿主細胞に感染させ、ヘルパーウイルスから供給されたアデノウイルスの増殖に必須の蛋白質により、ヘルパーウイルスとともに目的ベクターウイルスも増殖させるという方法が取られている(Mitani, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.92, 3854-3858 (1995))。このヘルパーウイルスを用いた組換えアデノウイルス作製法においては、目的ベクターウイルスに対しヘルパーウイルスの量が少ない、すなわちヘルパーウイルスの増殖が抑制されているほど望ましい。

10 【0004】そのための方策の一つとして、ヘルパーウイルスゲノムのパッケージング配列の両側にリコンビナーゼ Cre の認識配列である loxP 配列を挿入したヘルパーウイルスを目的ベクターウイルスとともにリコンビナーゼ Cre を発現する宿主細胞に感染させて、パッケージング配列を除き、ヘルパーウイルスのゲノム DNA がウイルス粒子にパッケージングされなくなることにより、ヘルパーウイルスの増殖を抑制する工夫(Parks, R. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 13565-13570 (1996)) がなされている。

20 【0005】パッケージング配列の両側に loxP 配列を挿入したヘルパーウイルスは、それ単独で増殖させる場合は、増殖が抑制されないことおよび挿入した loxP 配列が欠落しないことが重要であり、特にパッケージング配列の左側、すなわちアデノウイルス左端逆方向反復配列(inverted terminal repeat: ITR)とパッケージング配列との間の loxP 配列の挿入部位は重要である。なぜならば、左端 ITR とパッケージング配列との間に外来遺伝子を挿入可能な領域は、わずか 100 塩基足らずの範囲しかないからである。前述したヘルパーウイルスの loxP 配列挿入部位は、アデノウイルス 5 型の塩基配列 188 位である(Parks, R. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 13565-13570 (1996))。また、他の loxP 配列の挿入例として、アデノウイルス 5 型の塩基配列 193 位と 194 位との間が報告されている(Hardy, S. et al., J. Virol. Vol.71, 1842-1849 (1997))が、これらの挿入部位はいずれもパッケージング配列の直前であり、これらの部位がリコンビナーゼ認識配列の挿入部位として最善かどうかは明らかでない。

【0006】

40 【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、遺伝子治療の分野において一層安全性の高い遺伝子治療用ベクターの作製のための材料として、アデノウイルス左端 ITR とパッケージング配列との間の新たな位置にリコンビナーゼ認識配列を挿入した組換えアデノウイルスを提供することにある。

【0007】

50 【課題を解決するための手段】本発明者らは、ヒトアデノウイルス 5 型を用いて、左端 ITR とパッケージング配列との間で、リコンビナーゼ認識配列の挿入可能な部位を検索し、新たなリコンビナーゼ認識配列の挿入部位を

発見した。かかる知見に基づき、当該部位にリコンビナーゼ認識配列の一つであるloxP配列を挿入した新たな組換えアデノウイルスを作製し、かつ当該アデノウイルスを、当該部位にloxP配列が挿入されていない他の組換えアデノウイルスと同等のウイルス力価を保持させることに成功した。

【0008】すなわち、本発明の要旨は、

〔1〕 下記配列：

(1) 左端逆方向反復配列、(2) パッケージング配列、(3) 前記左端逆方向反復配列と前記パッケージング配列の中間領域に位置するリコンビナーゼ認識配列、および(4) 前記パッケージング配列の下流領域に位置する、前記リコンビナーゼ認識配列を認識するリコンビナーゼにより認識される少なくとももう1つのリコンビナーゼ認識配列、をゲノム中に含有してなる組換えアデノウイルス、に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明において、「組換えアデノウイルス」とは、アデノウイルス固有の塩基配列以外の塩基配列をそのゲノム中に含有するアデノウイルスのことをいう。アデノウイルス固有の塩基配列以外の塩基配列には特に制限はなく、蛋白質をコードする遺伝子やプロモーターやポリA配列などの調節遺伝子であってもよいし、また何ら機能を有さない塩基配列であってもよい。

【0010】本発明において、「左端逆方向反復配列」(以下、左端ITRと略す)とは、アデノウイルスゲノムの複製開始に必須なゲノム両端の塩基配列のうち、左端(即ち、E1遺伝子の上流側)に存在する塩基配列のことをいう。その具体例として、ヒトアデノウイルス5型においては、塩基配列1位～103位が挙げられる。

【0011】本発明において、「パッケージング配列」とは、アデノウイルスゲノムDNAがアデノウイルス粒子に挿入されるために必須の塩基配列をいう。その具体例として、ヒトアデノウイルス5型においては、塩基配列195位～358位が挙げられる。

【0012】本発明において、「リコンビナーゼ認識配列」とは、特異的DNA組換え酵素である「リコンビナーゼ」により認識される塩基配列であって、「リコンビナーゼ」存在下に二つの「リコンビナーゼ認識配列」間で、DNA鎖の切断、DNA鎖の交換と結合の全行程の反応が可能となる塩基配列のことをいう。

【0013】「リコンビナーゼ」の例としては、バクテリオファージP1由来のリコンビナーゼCre (Sternberg et al., J. Mol. Biol. Vol.150, 467-486 (1981))、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の2ミクロンDNAによりコードされるFLP (Babineau et al., J. Biol. Chem. Vol.260, 12313-12319 (1985))、チゴサッカロマイセス・ルーイのpSR1プラスミド由来のR (Matsuzaki et al., Mol. Cell. Biol. Vol.8, 955-962 (1988))

8))などが挙げられる。

【0014】本発明において、「パッケージング配列の下流領域」とは、パッケージング配列から右端(即ち、E1遺伝子の下流側)ITRの間の領域をいう。その具体例として、ヒトアデノウイルス5型においては、塩基配列359位以降が挙げられる。

【0015】本発明において、「リコンビナーゼ認識配列がバクテリオファージP1由来のリコンビナーゼCreの基質となる」とは、リコンビナーゼCreにより、二つの「リコンビナーゼ認識配列」間で、DNA鎖の切断、DNA鎖の交換と結合の全行程の反応が起きることをいう。

「リコンビナーゼ認識配列」の典型的な例としては、バクテリオファージP1内の34塩基からなるloxP配列 (Abremski et al., J. Biol. Chem., 1509-1514 (1984)) および Hoess et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.81, 1026-1029 (1984))が挙げられる。loxP配列は下記の塩基配列からなるDNA配列であり、以後この配列のことを野生型loxP配列という。

【0016】5'-ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTA T-3' (配列番号：1)

3'-TATTGAAGCATAT TACATACG ATATGCTTCAATA-5' (配列番号：2)

(前記配列中、下線部はスペーサー領域を示す)

【0017】本発明において、「リコンビナーゼCreの基質となる『リコンビナーゼ認識配列』」とは前記野生型loxP配列に限定される必要はなく、二つの「リコンビナーゼ認識配列」がリコンビナーゼCre基質となる限りは、野生型loxP配列の一部が他の塩基に置換されていてもよい。さらに、野生型loxP配列の塩基の置換により、野生型loxP配列との組合せではリコンビナーゼCreの基質とならないloxP配列(変異型loxP配列)であっても、二つの同じ配列の変異型loxP配列どおしではリコンビナーゼCreの基質となる、すなわちDNA鎖の切断、DNA鎖の交換と結合の全行程の反応が起きる配列は、リコンビナーゼCreの認識配列に含まれる。そのような変異型loxP配列の例として、野生型loxP配列のスペーサー領域の一つの塩基を置換したloxP配列 (Hoess et al., Nucleic Acids Res. Vol.14, 2287-2300(1986)) やスペーサー領域の二つの塩基を置換したloxP配列 (Lee, G. et al., Gene Vol.14, 55-65 (1998)) が挙げられる。

【0018】本発明において、「リコンビナーゼ認識配列がリコンビナーゼFLPの基質となる」とは、リコンビナーゼFLPにより、二つの「リコンビナーゼ認識配列」間で、DNA鎖の切断、DNA鎖の交換と結合の全行程の反応が起きることをいう。「リコンビナーゼ認識配列」の典型的な例としては、酵母由来のFRT配列 (Babineau et al., J. Biol. Chem. Vol.260, 12313-12319 (1985)) が挙げられる。FRT配列は34塩基からなるDNA配列で、本来の配列(野生型FRT配列)は野生型loxP配列と同様に一義的に規定されているが、本発明において、「リコ

ンビナーゼFLPの基質となる『リコンビナーゼ認識配列』とは前記野生型FRT 配列に限定される必要はなく、二つの「リコンビナーゼ認識配列」がリコンビナーゼFLP 基質となる限りは、野生型FRT 配列の一部が他の塩基に置換されていてもよい。さらに、野生型FRT 配列の塩基の置換により、野生型FRT 配列との組合せではリコンビナーゼFLP の基質とならないFRT 配列(変異型FRT 配列)であっても、二つの同じ配列の変異型FRT 配列どおしではリコンビナーゼFLP の基質となる、すなわちDNA 鎖の切断、DNA 鎖の交換と結合の全行程の反応が起きる配列は、リコンビナーゼFLP の認識配列に含まれる。

【0019】本発明の組換えアデノウイルスは、さらに外来遺伝子含有していてもよく、外来遺伝子としてはヒトの治療用遺伝子や、LacZ遺伝子等のいわゆるレポーター遺伝子、リコンビナーゼ等が挙げられる。外来遺伝子の挿入位置としては、E1遺伝子欠失部位、E3遺伝子欠失部位等が挙げられる。

【0020】本発明に用いる組換えアデノウイルスの由来は特に限定されないが、ヒト由来のアデノウイルスであることが好ましい。ヒト由来のアデノウイルスにおいては、C型に分類される2型または5型がより好ましい。以下、ヒトアデノウイルス5型を例として、また「リコンビナーゼ認識配列」の例としてloxP配列(野生型)を用いて、本発明をさらに詳細に説明する。

【0021】組換えアデノウイルスの作製法としては、アデノウイルスゲノムDNA に目的DNA を直接連結する方法や、アデノウイルスゲノムを分割して二つのプラスミドに挿入したプラスミドの一方に、目的DNA を挿入後相同組換えにより組換えアデノウイルスを作製する方法などが知られている。しかし、本発明では、アデノウイルスゲノムの大部分を含むコスミドベクターに目的遺伝子を挿入後、このコスミドベクターと制限酵素消化したアデノウイルスDNA 一末端蛋白質複合体との相同組換えによる方法(COS-TPC 法: Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 1320-1324 (1996)、および特開平7-298877号公報)により組換えアデノウイルスを作製することが好ましい。その理由は、かかる方法では非常に効率よく目的の組換えアデノウイルスが得られるからである。

【0022】まず、アデノウイルスE1及びE3遺伝子以外のアデノウイルス5型ゲノムの大部分を含むコスミドベクターpAxcw (図1、特開平8-308585号公報、15頁のpAdex1cwはpAxcw と同一である)の左端ITR とパッケージング配列との間に位置する、塩基配列147 位と148 位との間にloxP配列を挿入したコスミドベクターpAxcw15Lを作製する。その際、塩基配列143 位~148 位に認識配列が存在する制限酵素AfIIIでアデノウイルスゲノムを含むDNA を切断し、さらにKlenow酵素による平滑化処理後loxP配列を含む65塩基の合成DNA を連結する。この操作

によりAfIII消化により突出した4塩基が重複してloxP挿入部位に存在することになる。従って、塩基配列147 位と148 位との間への挿入とは、実際には143 位~148 位のいずれかの位置にloxP配列を挿入したことになる。

【0023】また、従来知られている挿入部位(塩基配列188 位または193 位)と比較するため、これらの挿入部位の間に位置する塩基配列191 位と192 位との間にloxP配列を挿入したコスミドベクターpAxcw19Lも作製する。この場合も、塩基配列186位~193 位に認識配列が存在する制限酵素SgrAI でアデノウイルスゲノムを含むDNA を切断し、さらにKlenow酵素による平滑化処理後loxP配列を含む65塩基の合成DNA を連結するため、SgrAI 消化により突出した4塩基が重複してloxP挿入部位に存在することになる。従って、塩基配列191 位と192 位との間への挿入とは、実際には187 位~192 位のいずれかの位置にloxP配列を挿入したことになる。

【0024】次いで、コスミドベクターpAxcw15LのE1遺伝子欠失部位に、loxP配列/EF1 α プロモーター/LacZ/ポリA配列を挿入したコスミドベクターpAxLEFLacZ15Lを作製する。同様に、コスミドベクターpAxcw19にloxP配列/EF1 α プロモーター/LacZ/ポリA配列を挿入したコスミドベクターpAxLEFLacZ19Lも作製する。これらのコスミドベクターを用い、前述したCOS-TPC 法により目的の組換えアデノウイルスAxLEFLacZ15LおよびAxLEFLacZ19L(図4)を作製する。本発明者らが開発したCOS-TPC 法は非常に効率よく目的の組換えアデノウイルスが得られる方法であり、制限酵素消化したアデノウイルスDNA 一末端蛋白質複合体と目的ウイルスの構造を有するコスミドベクターとで形質転換した細胞をクローン化後、任意のクローンを選ぶとその半数以上が目的組換えウイルスである(Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 1320-1324 (1996))。

【0025】組換えアデノウイルスAxLEFLacZ15L作製時の目的クローンの出現頻度は、例えば、6クローン中4クローンであり、本発明者らによる組換えアデノウイルス作製時に通常得られる目的クローンの出現頻度とほぼ同じである。一方、AxLEFLacZ19L作製時の目的クローンの出現頻度は、例えば、12クローン中3クローンと明らかに低い。さらに、AxLEFLacZ15Lは通常の組換えアデノウイルスとほぼ同程度の力価を保持している。この目的組換えウイルスの出現頻度の差は、ITR とパッケージング配列との間に挿入したloxP配列が、アデノウイルスの増殖に及ぼす影響を反映するものである。すなわち、塩基配列143 位~148 位への挿入(AxLEFLacZ15L)は、アデノウイルスの増殖にほとんど影響しないが、塩基配列187 位~192 位への挿入は、アデノウイルスDNA のウイルス粒子へのパッケージング過程を含めたウイルスの増殖サイクルに負の影響を及ぼすことが明らかとなった。従って、本発明者らが新たに発見した塩基配列143 位~148 位への挿入部位は、従来知られていた挿入部位(塩

基配列188 位または193 位) よりも、アデノウイルスの増殖に好適な挿入部位であることが判明した。

【0026】このようにして得られた塩基配列143 位～148 位へloxP配列を挿入した組換えアデノウイルスは、パッケージング配列より右側の任意に位置にもう一つのloxPを挿入することにより、ヘルパーウイルスとして作用させることができる。その方法は、前記したように、ヘルパーウイルスゲノムのパッケージング配列の両側にリコンビナーゼCre の認識配列であるloxP配列を挿入したヘルパーウイルスを目的ベクターウイルスとともにリコンビナーゼCre を発現する宿主細胞に感染させて、パッケージング配列を除き、ヘルパーウイルスのゲノムDNA がウイルス粒子にパッケージングされなくなることであり、ヘルパーウイルスの増殖を抑制する方法である

(Parks, RJ. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.9 3, 13565-13570 (1996))。その際、パッケージング配列右側のもう一つのloxP配列の挿入位置に制限はなく、その例の一つとしてアデノウイルスE1A 遺伝子の欠失部位が挙げられる。本発明の組換えアデノウイルスAxLEFL acZ15Lは、その一例である。

【0027】さらに、本発明の組換えアデノウイルスは前述した変異型loxP配列と組み合わせることにより、遺伝子置換型組換えアデノウイルスの作製にも応用できる。ここにいう「遺伝子置換型組換えアデノウイルスの作製」とは、例えば外来遺伝子Aを有する組換えアデノウイルスの遺伝子Aを、リコンビナーゼCre の存在下にプラスミドなど他のDNA 分子に存在する遺伝子Bに置換する方法のことである。その方法の一例を以下に説明する。

【0028】遺伝子Aを有する遺伝子置換用組換えアデノウイルスとして、左端ITR /野生型loxP配列(塩基配列143 位～148 位に挿入) /パッケージング配列/野生型loxP配列/遺伝子A /変異型loxP配列、の順に野生型loxP配列および変異型loxP配列を挿入した組換えアデノウイルスを作製する。ここに野生型loxP配列/遺伝子Aの断片はE1欠失部位に挿入される。遺伝子Bを有するプラスミドとしては、野生型loxP配列(塩基配列143 位～148 位に挿入) /パッケージング配列/遺伝子B /変異型loxP配列の構造を有するプラスミドが挙げられる。遺伝子Aを有する組換えアデノウイルスと遺伝子Bを有するプラスミドを同時にまたは順次、Cre蛋白質を発現する293 細胞などの細胞に導入すると、遺伝子導入用組換えアデノウイルスでは2つの野生型loxP配列に挟まれたパッケージング配列が除かれるとともに、野生型loxP配列/遺伝子A /変異型loxP配列の部分のプラスミド由来の野生型loxP配列/パッケージング配列/遺伝子B /変異型loxP配列に置換された組換えアデノウイルスが生成する。遺伝子置換されなかった遺伝子導入用組換えアデノウイルスは、二つの野生型loxP配列に挟まれたパッケージング配列が除去されるため、ウイルスDNA は複製す

るものの感染粒子にパッケージングされずウイルスとしては増殖しない。一方、遺伝子置換されたアデノウイルスはプラスミドから導入されたパッケージング配列を有するため、感染粒子にパッケージングされて増殖し、「遺伝子A」が「遺伝子B」に置換された組換えアデノウイルスが高頻度に得られる。

【0029】さらに、遺伝子導入用組換えアデノウイルスの変異型loxP配列の挿入位置を変えることにより、アデノウイルス由来の蛋白質をコードする遺伝子の一部または全てを除いた組換えアデノウイルスを作製することもできる。この場合の変異型loxP配列の挿入位置の例として、アデノウイルスL3遺伝子とE2A 遺伝子との間の非翻訳領域、E3遺伝子の欠失部位、E4遺伝子の上流域と右端ITR との間などが挙げられる。これらの位置に変異型loxP配列を挿入して遺伝子置換を行う場合、生成するアデノウイルスDNA が感染粒子に効率よくパッケージングされるように、遺伝子Bを有するプラスミドの野生型loxP配列-変異型loxP配列間のDNA のサイズを調節する必要があるが、生成した組換えアデノウイルスは遺伝子置換「遺伝子A」が「遺伝子B」に置換されるだけでなく、野生型loxP配列/遺伝子A /変異型loxP配列間のDNA がプラスミドの野生型loxP配列- (遺伝子B) -変異型loxP配列間のDNA に置換されるため、遺伝子A /変異型loxP配列間に存在するアデノウイルス遺伝子を欠失した組換えアデノウイルスを作製することができる。

【0030】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなら限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更ができることは言うまでもない。なお、実施例中のファージ、プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞等を取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis 編、第2版(1989), Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行なった。

【0031】実施例1

アデノウイルス5型ゲノムの塩基配列147 位と148 位との間にloxP配列を挿入した組換えアデノウイルス作製用のコスミドベクターの作製

① アデノウイルスE1及びE3遺伝子以外のアデノウイルス5型ゲノムの大部分を含み、かつE1遺伝子欠失部位にポリリンカーのみが挿入されたコスミドベクターpAxcw (図1、特開平8-308585号公報、15頁のpAdex1cwはpAxcw と同一である) をSalIで消化後自己ライゲーションさせ、アデノウイルスゲノム左端約0.4kb を含むプラスミドpxcw (3.1kb) を得た。

【0032】次にプラスミドpxcwをAf1IIIで消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化した後、loxP配列を含む66塩基の合成DNA (塩基配列: 5'-GCTCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATACGCGTTCGTCGGTACCCGCCAT

10

20

30

40

50

G-3' (配列番号: 3) およびその相補鎖、図 2 参照) を連結し、アデノウイルスゲノムの 147 位と 148 位との間に loxP 配列が挿入されたプラスミド pycw15L (3.2kb) を得た。プラスミド pycw15L 中のアデノウイルス 5 型ゲノムの左端から 521 bp までの塩基配列を図 2 と配列番号: 4 に示す。

【0033】② コスミドベクター pAxcw を SmaI および Csp45I で同時に消化し、アデノウイルスゲノムの大部分を含む約 28kb の断片 (a) を得た。また、コスミドベクター pAxcw を Csp45I および PstI で同時に消化し、アデノウイルスゲノムを含まない約 13kb の断片 (b) を得た。さらに、プラスミド pycw15L を SmaI および PstI で同時に消化し、アデノウイルスゲノム左端を含む約 1.2kb の断片 (c) を得た。次いで、(a)(b)(c) の 3 断片をライゲーションし、アデノウイルスゲノムの大部分を含み、かつ 147 位と 148 位の間に loxP 配列が挿入されたコスミドベクター pAxcw15L を得た。

【0034】③ プラスミド pUC119 の制限酵素 Ecl136II 部位に、野生型 loxP 配列/制限酵素 SmaI 部位/野生型 loxP 配列が挿入されたプラスミド puLwL (Lee G. et al. GeneVol.14, 55-65 (1998)) を制限酵素 XhoI で消化後、変異型 loxP 配列および制限酵素 NheI 部位を含む 60 塩基の合成 DNA (配列番号: 5 および配列番号: 6) を連結し、SmaI 部位とアンピシリン耐性遺伝子との間に位置する野生型 loxP 配列を変異型 loxP 配列に置換したプラスミド puLwM を得た。

5'-TCGAGTCCGGAATAACTTCGTATAACGTATACTATACGAAGTTATGCTAGCATTTAAATG-3' (配列番号: 5)

3'-CAGGCCTTATTGAAGCATATTGCATATGATGCTTCAATACGATCGTAAATTTACAGCT-5' (配列番号: 6)

【0035】④ EF1 α プロモーターから LacZ 遺伝子を発現するプラスミド pEFLacZ (特開平 7-298877 号公報、11 頁) を HindIII で消化後末端を平滑化し、プロモーター/LacZ/ポリ A 配列を含む断片を得た。この断片を、プラスミド pUC119 の Ecl136II 部位に loxP 配列/SmaI 部位/変異型 loxP 配列が挿入された前記③で得られたプラスミド puLwM の SmaI 部位に挿入し、プラスミド pULEFLacZM (9.1kb、図 3) を得た。次いで、プラスミド pULEFLacZM を NheI および Asp718 で同時に消化後末端を平滑化し、loxP 配列/プロモーター/LacZ/ポリ A 配列を含む断片を得た。さらに、この断片をコスミド pAxcw15L の SmaI 部位に挿入したコスミド pAxLEFLacZ15L を得た。

【0036】実施例 2

アデノウイルス 5 型ゲノムの塩基配列 191 位と 192 位との間に loxP 配列を挿入した組換えアデノウイルス作製用のコスミドベクターの作製

① 実施例 1 の①で作製したプラスミド pxcw を SgrAI で消化し、さらに Klenow 酵素により両端を平滑化した後、loxP 配列を含む 68 塩基の合成 DNA (塩基配列: 5'-GTACTCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATACGCGTTCGCTC

GGTACCCGGCCGG-3'、(配列番号: 7) およびその相補鎖、図 2 参照) を挿入し、アデノウイルスゲノムの 191 位と 192 位との間に loxP 配列が挿入されたプラスミド pycw19L (3.2kb) を得た。プラスミド pycw19L 中のアデノウイルス 5 型ゲノムの左端から 523bp までの塩基配列を図 2 と配列番号: 8 に示す。

【0037】② プラスミド pycw19L を SmaI および PstI で同時に消化して得たアデノウイルスゲノム左端を含む約 1.2kb の断片と、実施例 1 ②で調製した pAxcw を SmaI および Csp45I で同時に消化した断片 (a)、ならびに pAxcw を Csp45I および PstI で同時に消化した断片 (b) の 3 断片をライゲーションし、アデノウイルスゲノムの大部分を含み、かつ 191 位と 192 位との間に loxP 配列が挿入されたコスミドベクター pAxcw19L を得た。

【0038】③ 実施例 1 ④で調製したプラスミド pULEFLacZM より得た loxP 配列/プロモーター/LacZ/ポリ A 配列を含む断片を、コスミド pAxcw19L の SmaI 部位に挿入し、コスミド pAxLEFLacZ19L を得た。

【0039】実施例 3

アデノウイルス 5 型ゲノムの塩基配列 147 位と 148 位との間、または 191 位と 192 位との間に loxP 配列を挿入し、かつ LacZ 遺伝子の発現単位を有する組換えアデノウイルスの作製

① 組換えアデノウイルスの作製

実施例 1、2 で作製したコスミドベクター (pAxLEFLacZ15L、pAxLEFLacZ19L) を用い、アデノウイルス 5 型由来の非増殖型アデノウイルスベクター (E1 及び E3 遺伝子を欠失) の ITR とパッケージング配列との間に loxP 配列を挿入し、かつ E1 遺伝子欠失部位に loxP 配列/EF1 α プロモーター/LacZ/ポリ A 配列を挿入した組換えアデノウイルスを作製した。組換えアデノウイルスの作製法、ならびにウイルス DNA の制限酵素消化による目的組換えアデノウイルスの同定法は既存の方法 (Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 1320-1324 (1996)、及び特開平 7-298877 号公報) に従った。

【0040】E3 遺伝子を欠失したヒトアデノウイルス 5 型由来株である Ad5-d1X (Saito, I. et al., J. Virology, Vol.54, 711-719 (1985)) のウイルス DNA 一末端蛋白質複合体を制限酵素 EcoT22I で消化した。このウイルス DNA 一末端蛋白質複合体と、コスミドベクター pAxLEFLacZ15L (実施例 1 で作製) もしくはコスミドベクター pAxLEFLacZ19L (実施例 2 で作製) とで、リン酸カルシウム共沈法により 6cm シャーレで培養した 293 細胞を形質転換した。翌日、形質転換した細胞を希釈後、96 穴マイクロプレートにまき直し、2~3 週間培養した。ウイルスの増殖により細胞変成が起こった任意のウェルを選びウイルス液 (一次ウイルス液) を調製し、24 穴マイクロプレートで培養した 293 細胞に 2 ウェルずつ感染させ、細胞変成が生じた後に片方のウェルから既存の方法によりウイルス DNA を調製した。ウイルス DNA を XhoI 消

化後、電気泳動によりウイルスのゲノム構造を解析し、目的組換えアデノウイルス（AxLEFLacZ15LまたはAxLEFLacZ19L、図4）クローンを同定した。

【0041】通常、この方法で作製した組換えアデノウイルスは、任意に選んだウイルスクローンの半数以上が目的ウイルスクローンである。AxLEFLacZ15Lの場合は6クローン中4クローンが目的クローンであり、その出現頻度は、本発明者らによる組換えアデノウイルス作製時に通常得られる目的クローンの出現頻度とほぼ同じであった。一方、AxLEFLacZ19Lの場合は12クローン中3クロー

ンが目的クローンであり、その出現頻度はAxLEFLacZ15Lの場合よりも低かった。

【0042】ウイルスDNAの解析に用いなかったウェルより、AxLEFLacZ15Lは#3クローンの、AxLEFLacZ19Lは#3クローンのウイルス液（二次ウイルス液）を調製し、さらに順次スケールアップしてウイルスを継代し、最終的に四次ウイルス液を得た。

【0043】② AxLEFLacZ15LならびにAxLEFLacZ19Lの力価測定

AxLEFLacZ15LならびにAxLEFLacZ19Lの四次ウイルス液の力価を293細胞を用いて測定した。力価測定は、既存の*

*方法（特開平7-298877号公報）に従い、96穴マイクロプレートを用いた限界希釈法にて行った。

【0044】その結果、AxLEFLacZ15Lの力価は 3.4×10^8 PFU/ml、AxLEFLacZ19Lの力価は 3.4×10^8 PFU/mlであり、両ウイルスとも通常の新増殖型組換えアデノウイルスとほぼ同等の力価を有していた。すなわち、ITRとパッケージング配列との間へのloxP配列を含む外来遺伝子の挿入は、アデノウイルスの増殖に致命的な欠陥を与えるものではないことが判明した。

10 【0045】

【発明の効果】本発明により、遺伝子治療の分野において一層安全性の高い遺伝子治療用ベクターを作製するための材料となる、組換えアデノウイルスが提供される。本発明により、アデノウイルスの増殖に必須の遺伝子を欠失した組換えアデノウイルスベクターの製造、および遺伝子置換型組換えアデノウイルスベクターの製造が効率的に行なわれ、遺伝子治療の分野で利用可能な組換えアデノウイルスベクターの供給が容易になる。

【0046】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Novel Recombinant Adenovirus

<130> SP-10-004

<160> 8

【0047】

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Bacteriophage P1

<400> 1

ataacttcgt ataagtgtatg ctatacgaag ttat

34

【0048】

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Bacteriophage P1

<400> 2

ataacttcgt atagcatata ttatacgaag ttat

34

【0049】

<210> 3

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gctcgagata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta tacgcgttcg ctcggtaccc
gccatg

60
66

【0050】

<210> 4

13

14

<211> 521

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

```

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt   60
ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt   120
gatgttgcaa gtgtggcgga acacatggct cgagataact tcgtataatg tatgctatac   180
gaagtatac gcgttcgctc ggtacccgcc atgtaagcga cggatgtggc aaaagtgcag   240
tttttggtgt gcgccgggtg acacaggaag tgacaatttt cgcgcggttt taggcggatg   300
ttgtagtaaa ttggggcgta accgagtaag atttgccat tttcgcggga aaactgaata   360
agaggaagtg aaatctgaat aattttgtgt tactcatagc gcgtaatatt tgtctagggc   420
cgcggggact ttgaccgttt acgtggagac tcgccaggt gtttttctca ggtgttttcc   480
gcgttccggg tcaaagttgg cgttttatta ttatagtcag c                        521

```

【0051】

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

```

tcgagtcagg aataacttc gtataacgta tactatacga gttatgctag catttaaatg   60

```

【0052】

<210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

```

tcgacattta aatgctagca taacttcgta tagtatacgt tatacgaagt tattccggac   60

```

【0053】

<210> 7

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

```

gtactcgaga taacttcgta taatgtatgc tatacgaagt tatacgcgtt cgctcggtag   60
ccggccggg                                     68

```

【0054】

<210> 8

<211> 523

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

```

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt   60
ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt   120
gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg   180
gtgtgcgccg ggtactcgag ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatacgcgt   240
tcgctcggta cccggccggg gtacacagga agtgacaatt ttcgcgcggt tttaggcgga   300
tgtttgtagta aatttgggcg taaccgagta agatttggcc attttcgcgg gaaaactgaa   360
taagaggaag tgaaatctga ataattttgt gttactcata gcgcgtaata ttgtctagg   420
gccgcgggga ctttgaccgt ttacgtggag actcgcccag gtgtttttct cagggtgttt   480
ccgcgttccg ggtcaaagtt ggcgttttat tattatagtc agc                        523

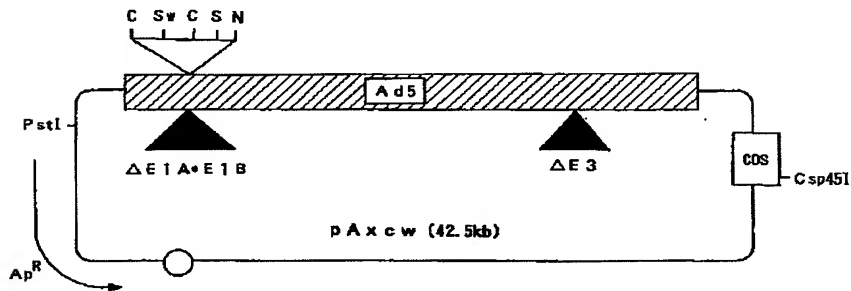
```


【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、コスミドベクターpAxcwの構造を示す模式図である。図中、斜線部分はアデノウイルスゲノムを、C、Sw、S、Nはそれぞれ、制限酵素ClaI、SwaI、SalI、NruI部位を示す。また、A^rはアンピシリン耐性遺伝子、丸印はプラスミドの複製起点を示す。

【図2】図2は、ヒトアデノウイルス5型の1番目から455番目までの塩基配列、ならびにITRとパッケージング配列との間に挿入したloxP配列を含む合成DNA（66bpおよび68bp）の塩基配列を示す。図中、上向きおよび下向きの三角はloxP配列を含むDNAの挿入位置を示し、下線を引いた塩基は制限酵素の認識配列を示す。また、挿入DNA中の太字の塩基配列は34塩基のloxP配列を、小文字の塩基配列は制限酵素の認識配列を示す。*

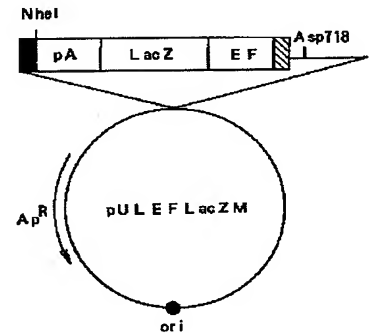
【図1】



* 【図3】図3は、プラスミドpULEFLacZMの構造を示す模式図である。図中、EFはEF1 αプロモーター、LacZは大腸菌LacZ遺伝子、pAはポリA配列、斜線を引いた部分はloxP配列、黒塗り部分は変異型loxP配列を示す。A^rはアンピシリン耐性遺伝子、oriはプラスミドの複製起点を示す。

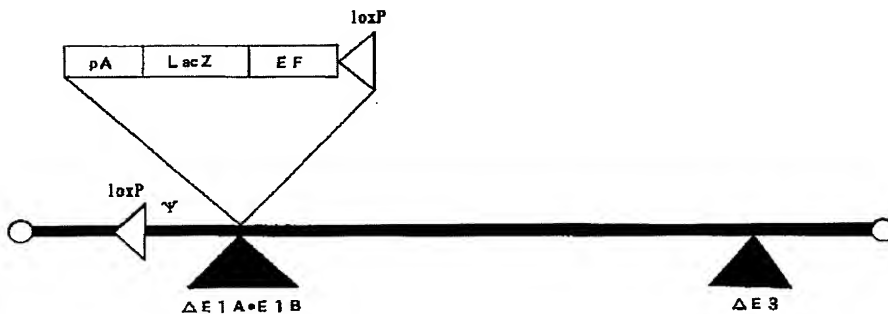
【図4】図4は、組換えアデノウイルス（AxLEFLacZ15LならびにAxLEFLacZ19L）の構造を示す模式図である。図中、太線部分はアデノウイルスゲノム、黒塗り三角は、欠失したアデノウイルス遺伝子、白抜き三角はloxP配列、EFはEF1 αプロモーター、LacZは大腸菌LacZ遺伝子、pAはポリA配列、Ψはアデノウイルスのパッケージング配列を示す。

【図3】



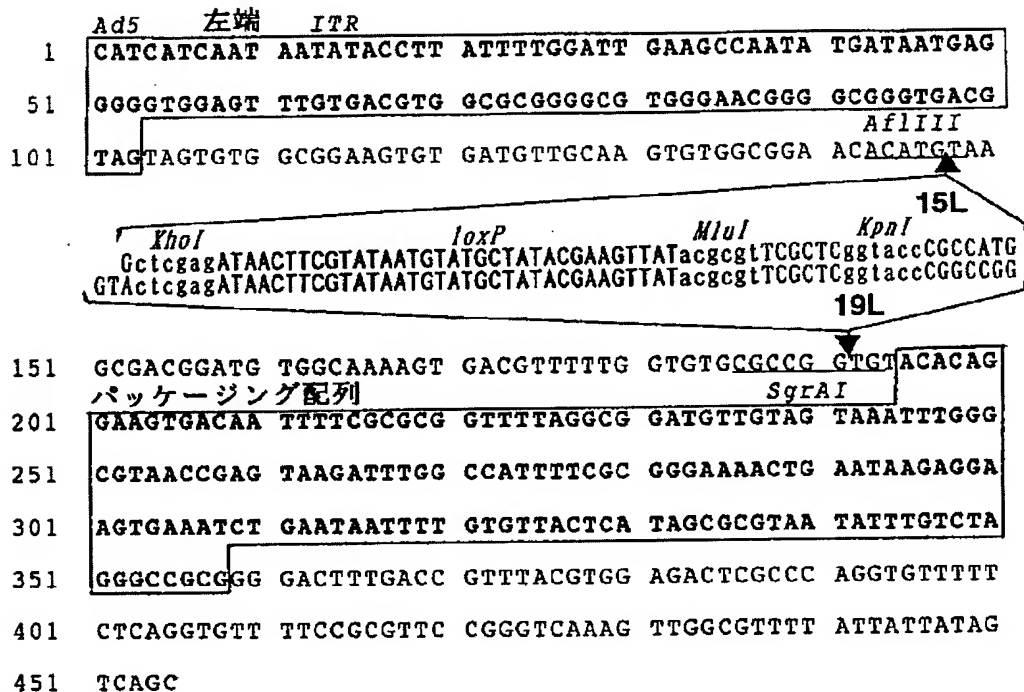
【図4】

AxLEFLacZ15LまたはAxLEFLacZ19L



【図2】

パッケージング配列に隣接するloxP配列の挿入部位



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA80 CA01 DA03
 EA04 EA06 FA02 GA11 GA18
 HA17
 4B065 AA93X AA95Y AB01 AC20
 BA01 BA02 BC01 BD50 CA44
 4C084 AA13 NA06 NA07 NA10